

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
 PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
 Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
 15. April 2004 (15.04.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/031199 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C07F 9/09, 9/10

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/010870

(22) Internationales Anmeldedatum:
 1. Oktober 2003 (01.10.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
 102 45 909.6 1. Oktober 2002 (01.10.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Hofgartenstrasse 8, 80539 München (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): EIBL, Hansjörg [DE/DE]; Heinrich-Deppe-Ring 22, 37120 Bovenden (DE).

(74) Anwälte: WEICKMANN, Franz, Albert usw.; Weickmann & Weickmann, Postfach 860 820, 81635 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärung gemäß Regel 4.17:

— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: LIPID-ANALOG PHOSPHORIC ACID TRIESTER

(54) Bezeichnung: LIPIDANALOG PHOSPHORSÄURETRIESTER

(57) Abstract: The invention relates to novel phosphoric acid triester containing apolar lipid structures.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft neue Phosphortriester, welche apolare Lipidstrukturen enthalten.

WO 2004/031199 A2

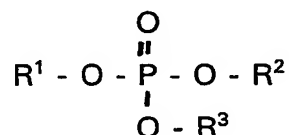
Lipidanaloge Phosphorsäuretriester

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Phosphorsäuretriester, welche apolare Lipidstrukturen enthalten.

Diese Triester können insbesondere als Liposomenbestandteile Verwendung finden.

Ein Gegenstand der Erfindung ist eine Verbindung der Formel (I)



worin R¹ einen Rest darstellt, ausgewählt aus Cholesterin, Diacylglycerinen, Dialkylglycerinen, Acylalkylglycerinen, Ceramiden, primären oder sekundären Alkoholen mit 12 bis 24 C-Atomen oder Acylglycero-benzylethern, R² einen Rest darstellt, ausgewählt aus Ethanolamin, N-Methylethanolamin, Propanolamin, Cholin, Glycerin, Oligoglycerinen, Glycoglycerinen oder Serin, welche gegebenenfalls Schutzgruppen enthalten können und R³ einen Rest darstellt, ausgewählt aus C₁-C₈-Alkyl oder C₁-C₈-Alkenyl oder die Bedeutung R² hat.

Bei den erfindungsgemäßen Verbindungen handelt es sich um Lipid-analoge Phosphorsäuretriester, insbesondere um Phosphorsäuretriester mit mehrfachen Hydroxylgruppen pro Phosphoratom, insbesondere mindestens zwei Hydroxylgruppen pro Phosphoratom, mehr bevorzugt mindestens drei Hydroxylgruppen pro Phosphoratom und noch mehr bevorzugt mindestens vier Hydroxylgruppen pro Phosphoratom.

Die erfindungsgemäßen Phosphorsäuretriester enthalten einen Rest R¹, welcher eine apolare Lipidstruktur enthält. Geeignete Strukturen für R¹ sind insbesondere Cholesterinreste, sodass es sich bei bevorzugten Phosphorsäuretriestern um Cholesteryl-Verbindungen handelt.

5

Ein weiterer bevorzugter Rest für R¹ ist Diacylglycerin, wobei die Acylgruppen jeweils unabhängig vorzugsweise 12 bis 28, insbesondere 13 bis 27 und mehr bevorzugt 14 bis 26 Kohlenstoffatome enthalten. Bei den Acylresten kann es sich um gesättigte oder ein- oder mehrfach, insbesondere zwei- oder dreifach ungesättigte Reste handeln. Besonders bevorzugt sind die Acylglycerine, welche ungesättigte Fettsäurereste, wie beispielsweise Reste von Ölsäure, Linolsäure oder Linolensäure enthalten.

10

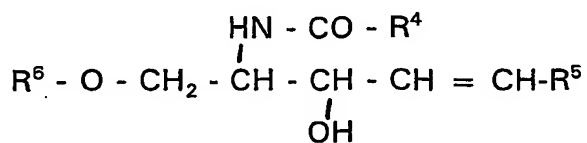
Bei dem Rest R¹ kann es sich erfindungsgemäß weiterhin um einen Dialkylglycerinrest handeln, wobei die Alkylreste darin jeweils unabhängig voneinander vorzugsweise 1 bis 28, insbesondere 12 bis 26, noch mehr bevorzugt 14 bis 24 Kohlenstoffatome aufweisen. Die Alkylreste im Dialkylglycerinrest können gesättigt oder ein- oder mehrfach, insbesondere zwei- oder dreifach ungesättigt sein. Bevorzugt sind die Reste (Z)-9-Octadecenyl-, (Z,Z.)-9.12-Octadecandienyl-, (Z,Z,Z)-9.12.15-Octadecantrienyl sowie lipophile Grundkörper mit pharmazeutischer Wirkung, wie 1-Octadecyl-2-methyl-sn-glycerin.

15

20

Weiterhin kann R¹ für einen Ceramidrest stehen. Ceramide sind körpereigene, besonders in der Hirnsubstanz und im Myelin des ZNS gebunden anzutreffende lipophile Amide der allgemeinen Formel (IV)

25



30

wobei R^4 ein langkettiger Fettsäurerest, insbesondere ein Fettsäurerest mit 12 bis 28 C-Atomen, R^5 ein langkettiger Alkylrest, insbesondere ein Alkylrest mit 12 bis 28 C-Atomen und $R^6 = H$ ist.

- 5 R^1 kann weiterhin für einen Rest eines primären oder sekundären Alkohols mit 12 bis 24 Kohlenstoffatomen, insbesondere 13 bis 22 Kohlenstoffatomen stehen, wobei die Alkohole gesättigt oder ein- oder mehrfach ungesättigt sein können.
- 10 R^1 kann weiterhin für einen Acylglycero-benzylether-Rest stehen, wobei solche Verbindungen insbesondere als Ausgangsprodukte für die Synthese von Lysophospholipiden eingesetzt werden können.

15 In den erfindungsgemäßen Verbindungen kann der Rest R^1 in enantiomer reiner Form oder als racemisches Gemisch vorliegen.

R^2 kann für alle Reste stehen, wie sie in natürlichen Phospholipiden und Sphingomyelinen vorkommen. Insbesondere steht R^2 für einen Ethanolaminrest, einen N-Methylethanolrest oder einen Propanolaminrest, wobei die Reste gegebenenfalls mit geeigneten Schutzgruppen, beispielsweise BOC versehen sind. R^2 kann weiterhin für einen Cholinrest stehen. Bevorzugt steht R^2 für $-CH_2-CH_2-N^+(CH_3)_3$. R^2 kann weiterhin für einen Glycerinrest ($-CH_2-CH(OH)-CH_2(OH)$) stehen sowie für einen Oligoglycerin-, insbesondere einen Di- oder Triglycerinrest. Weitere geeignete Reste R^2 sind Glycoglycerine, sowie Serinreste. Auch die Glycerin- und Serinreste können gegebenenfalls mit geeigneten Schutzgruppen versehen sein.

20

25

R^3 stellt einen Rest dar, ausgewählt aus C_1 - C_8 -Alkyl oder C_1 - C_8 -Alkenyl oder kann eine der oben für R^2 angegebenen Bedeutungen haben. Falls R^3 eine der für R^2 angegebenen Bedeutungen besitzt, können biologisch hochaktive Strukturen gebildet werden, die als neue kationische Lipide eine

30

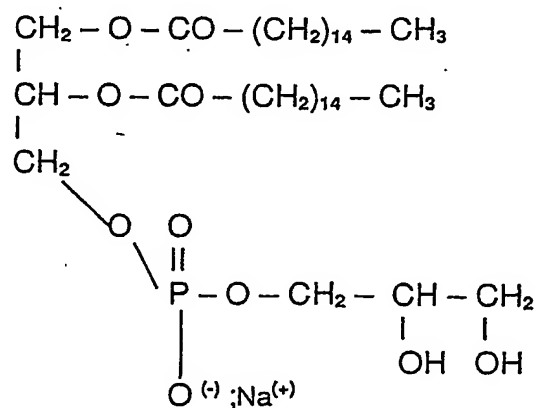
große Bedeutung haben. Solche kationischen Lipide können beispielsweise für die Gentransfektion eingesetzt werden.

R³ kann aber auch nur temporären Charakter haben, also die Funktion einer Schutzgruppe übernehmen, die später wieder abgelöst wird. In diesem Fall steht R³ bevorzugt für Methyl, Ethyl, Allyl oder Propyl.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind zwischen pH 3 und pH 8 sehr stabil und können insbesondere als Liposomenbestandteile Verwendung finden.

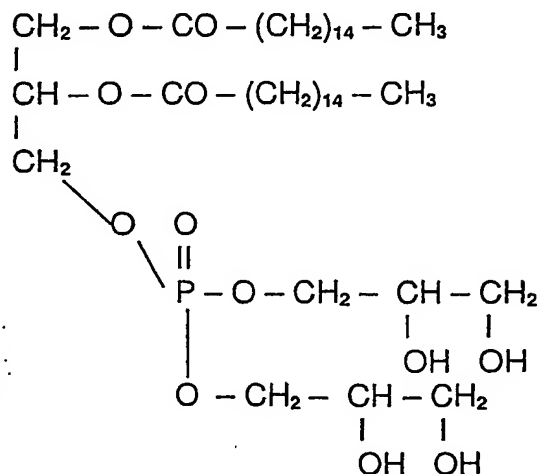
Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung einer Verbindung nach Formel (I), welches dadurch gekennzeichnet ist, dass man eine Verbindung der Formel (II) mit einer Verbindung der Formel (III) HO-R³ verestert.

Die Verbindungen leiten sich von Phospholipiden her und entstehen beispielsweise aus

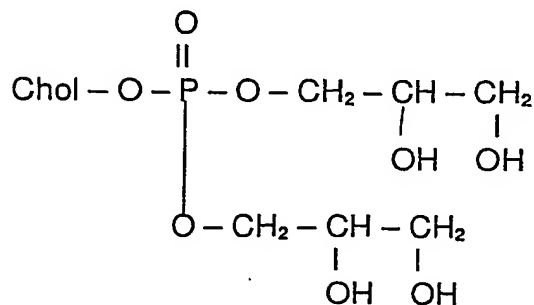


- 5 -

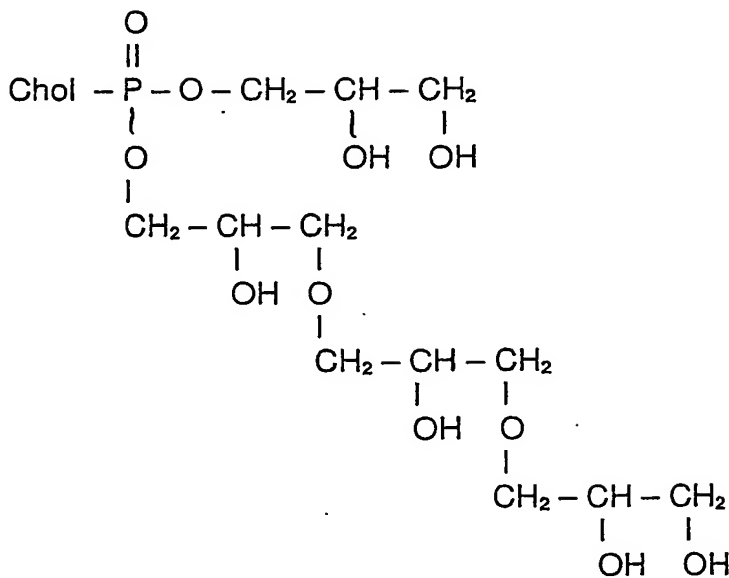
durch Veresterung des Phosphorsäurediesters mit Glycerin:



Entsprechend können auch Cholesterinderivate erhalten werden



Diese Verbindungen sind in unterschiedlichen Ausführungsformen herstellbar. Sie können auch Oligoglycerine, z.B. anstelle von Glycerin beispielsweise Glyceroglycerin, Diglyceroglycerin oder Triglyceroglycerin enthalten. Schematisch besitzt z.B. Cholesterinphospho-monoglycerin-triglyceroglycerin folgende Strukturformel:

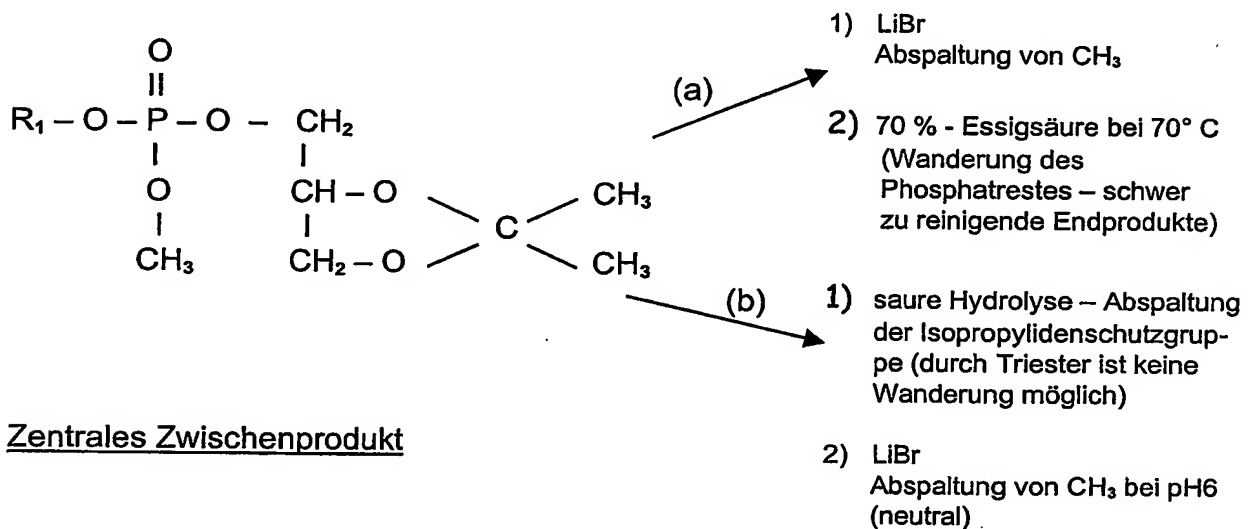


Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind insbesondere zur Herstellung von Liposomen bzw. als Liposomenbestandteile geeignet. Sie verleihen Liposomen besondere Eigenschaften, z.B. lange Zirkulationszeiten im Blut, gezielte Anreicherung in der Leber oder auch fast exklusive Aufnahme in der Milz. Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Phosphorsäuretriester können auch Liposomen mit neuen Eigenschaften gebildet werden, die eine hohe Serumstabilität aufweisen, lange Zirkulationszeiten besitzen und exklusiv in der Milz angereichert werden. Lange Zirkulationszeiten sind aber auch deshalb besonders wichtig, weil die Strukturen dann nicht, wie bekannte Liposomen, in der Leber angereichert werden sondern andere Ziele, wie z.B. die Milz treffen oder besonders wichtig, durch Tumorzellen aufgenommen werden können. Die erfindungsgemäßen Verbindungen können deshalb auch zur Behandlung von Krebserkrankungen eingesetzt werden.

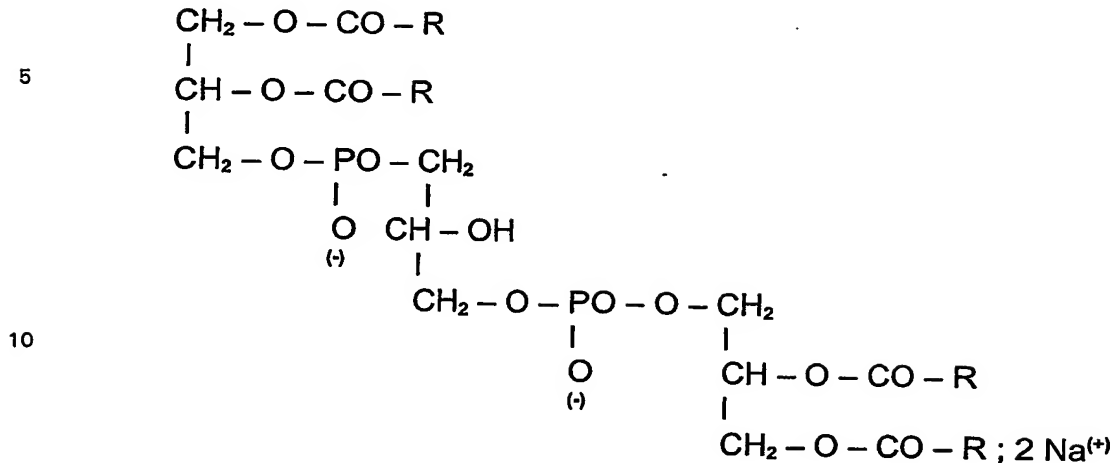
- 7 -

Die Erfindung betrifft weiterhin einen neuen Syntheseweg unter Verwendung der erfindungsgemäßen Phosphorsäuretriester als Zwischenstufe. Ein besonderer Vorteil des erfindungsgemäßen Synthesewegs ist, dass die in früheren Synthesen benutzte Reaktionsführung (a) vermieden wird und nach (b) die wichtige Verbindung 1.2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerin oder entsprechende Verbindungen unter neutralen Bedingungen freigelegt werden:

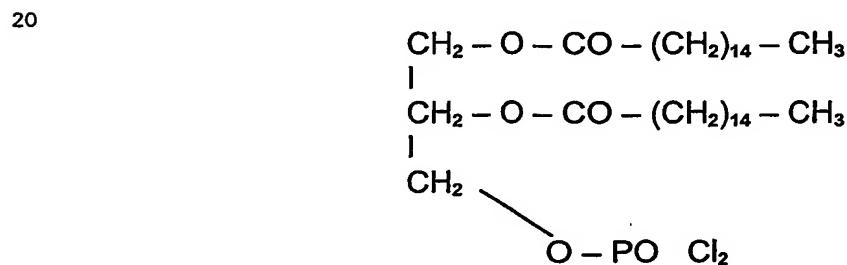
$R_1 = 1.2 - \text{Dioleoyl} - \text{sn} - \text{glycerin}$



Ein wesentlicher Vorteil bei der neuen Syntheseführung ist die Möglichkeit, apolare Zwischenprodukte möglichst weit in der Synthese voranzubringen, sodass polare Strukturen erst am Ende des Verfahrens eingeführt werden. Dies wird im Folgenden an einem Beispiel erläutert. Cardiolipine und analoge Verbindungen sind komplizierte Strukturen, die synthetisch in kg-Mengen nur äußerst schwer zugänglich sind. Mit Hilfe unserer neuen Synthesestrategie ist dies aber gut möglich.

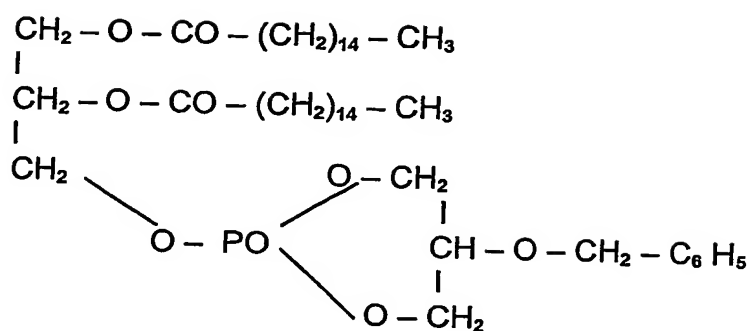
Cardiolipin

- Die Synthese wird für das Beispiel $\text{R} = \text{Palmitinsäure}$ beschrieben. Ausgangsprodukt ist 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycerin, das mit Phosphoroxychlorid in THF mit Triethylamin als Base in gewohnter Weise zu 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphorsäuredichlorid umgewandelt wird:

Baustein I

- Der einfache Weg zur Synthese von Cardiolipin, direkte Umsetzung mit 2-Benzyl-glycerin führt leider zur überwiegenden Bildung des entsprechenden Phospholans und ist nicht praktikabel:

5

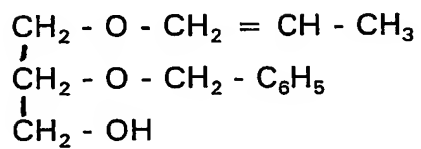


10

Deshalb muss Baustein II verwendet werden, ein geschütztes Glycerinderivat:

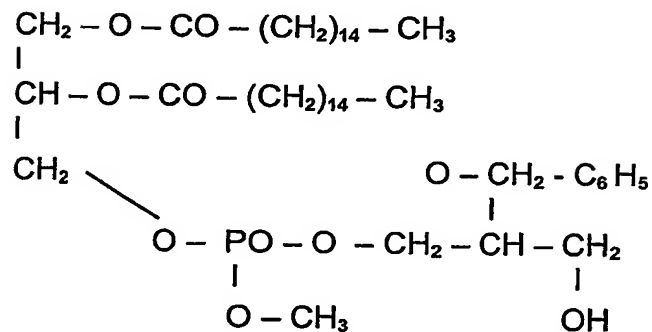
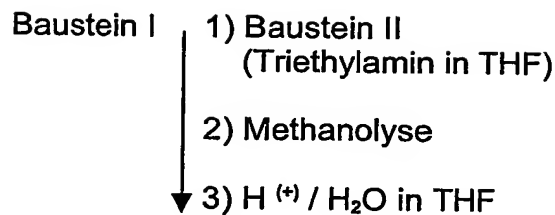
Baustein II

15

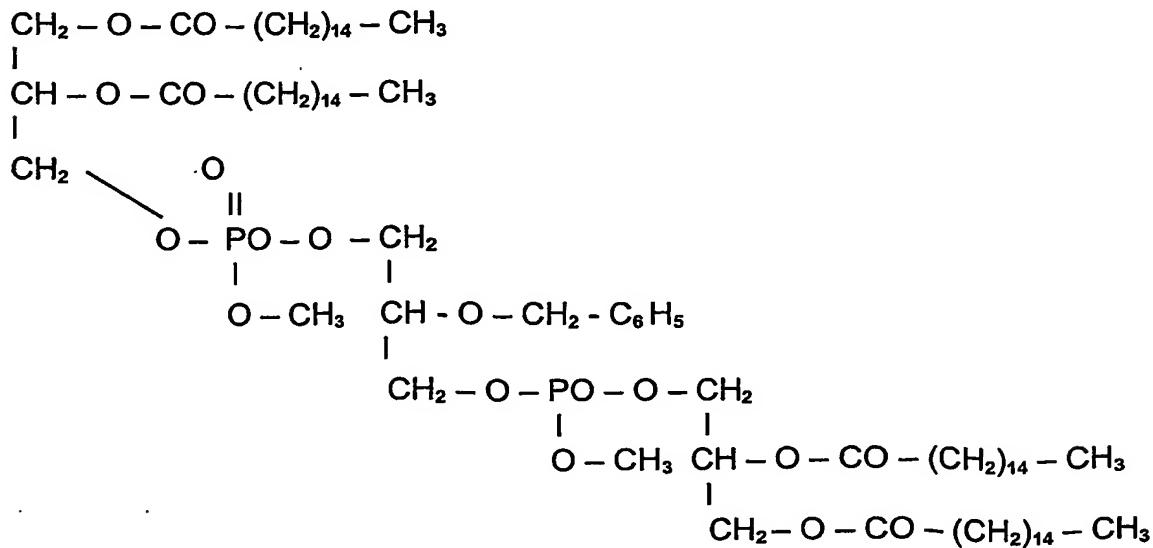


20

Die Verknüpfung von Baustein I mit Baustein II in THF mit Triethylamin führt dann zu Baustein III:

Baustein III

Baustein III kann dann mit Baustein I in üblicher Weise umgesetzt werden zu dem direkten Vorprodukt von Cardiolipin, das dann durch



Methanolyse in dem Dimethylester überführt wird. Durch katalytisch Hydrogenolyse wird dann die Hydroxylgruppe am mittleren Glycerin freigelegt. Die Methylgruppen werden durch LiBr bei neutralem pH entfernt - das Endprodukt ist Cardiolipin.

5

Die Beschreibung wird durch die folgenden Beispiele weiter erläutert.

Beispiel 1

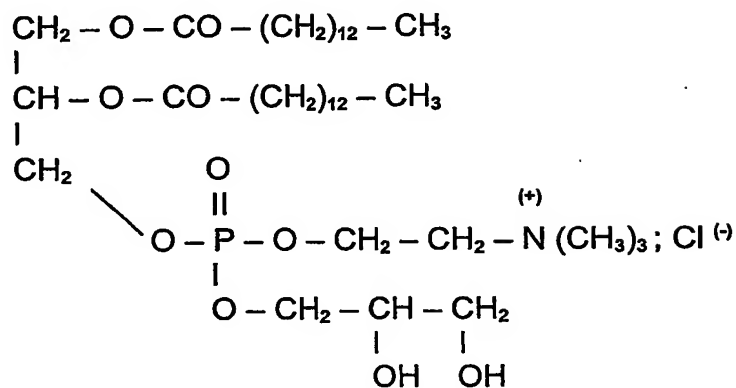
- 1) Cholesteryl – phospho – diglycerin
 $C_{33}H_{59}O_8P$ (MG 614.801)
- 2) Cholesteryl – phospho – glycerin – glyceroglycerin
 $C_{36}H_{65}O_{10}P$ (MG 688.880)
- 3) Cholesteryl – phospho – di – glykoglycerin
 $C_{37}H_{67}O_{10}P$ (MG 702.907)
- 4) 1.2 – Dimyristoyl – sn – glycerol – 3 – phospho – diglycerin
 $C_{37}H_{73}O_{12}P$ (MG 740.953)
- 5) 1.2 – Dipalmitoyl – sn – glycerol – 3 – phospho – diglycerin
 $C_{41}H_{81}O_{12}P$ (MG 797.061)
- 6) 1.2 – Distearoyl – sn – glycerol – 3 – phospho – diglycerin
 $C_{45}H_{89}O_{12}P$ (MG 853.169)
- 7) 1.2 – Dioleoyl – sn – glycerol – 3 – phospho – diglycerin
 $C_{45}H_{85}O_{12}P$ (MG 849.137)
- 8) 1.2 – Dioleoyl – sn – glycerol – 3 – phospho – di - glykoglycerin
 $C_{49}H_{93}O_{14}P$ (MG 937.243)
- 9) 1.2 – Dioleoyl – sn – glycerol – 3 – phospho – di - glyceroglycerin
 $C_{51}H_{97}O_{16}P$ (MG 997.295)

Beispiel 2

- 1) R₁: 1.2. - Dimyristoyl - glycerin
 R₂: Cholin
 R₃: Glycerin

5

10

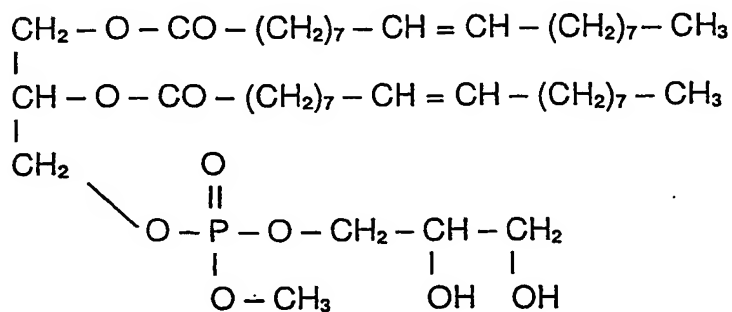


15

und entsprechende Strukturen mit 1.2. Dioleoylglycerin.

- 2) R₁: 1.2-Dioleoylglycerin
 R₂: Glycerin
 R₃: Methyl

20



Beispiel 3

Liposomen der Zusammensetzung

5

Molares Verhältnis

| | |
|---|-------------|
| 1.2 – Distearoyl – sn – glycerol – 3 – phosphocholin | 40 % |
| Cholesterin | 30 % |
| Cholesterin – phospho – diglycerin | 20 % |
| Cholesterin – phospho – glycerin, Na ⁽⁺⁾ -Salz | <u>10 %</u> |
| | 100 % |

10

reichern sich vorwiegend in der Milz an, während Liposomen der üblichen Zusammensetzung z.B.

15

| | |
|---|-------------|
| 1.2 – Distearoyl – sn – glycerol – 3 – phosphocholin | 50 % |
| Cholesterin | 40 % |
| 1.2 – Distearoyl – sn – glycerol – 3 – phosphoglycerin, | <u>10 %</u> |
| Na ⁽⁺⁾ -Salz | 100 % |

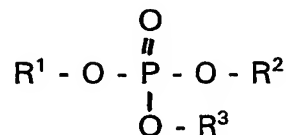
20

hauptsächlich in der Leber angereichert werden.

Ansprüche

1. Verbindung der Formel (I)

5



10 worin R¹ einen Rest darstellt, ausgewählt aus Cholesterin, Diacylglycerinen, Dialkylglycerinen, Acylalkylglycerinen, Ceramiden, primären oder sekundären Alkoholen mit 12 bis 24 C-Atomen oder Acylglycero-benzylethern,

15 R² einen Rest darstellt, ausgewählt aus Ethanolamin, N-Methylethanolamin, Propanolamin, Cholin, Glycerin, Oligoglycerinen, Glycoglycerinen oder Serin, welche gegebenenfalls Schutzgruppen enthalten können und

R³ einen Rest darstellt, ausgewählt aus C₁-C₈-Alkyl oder C₁-C₈-Alkenyl oder die Bedeutung R² hat.

20

2. Verbindung nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
dass R¹ für einen Cholesterinrest steht.

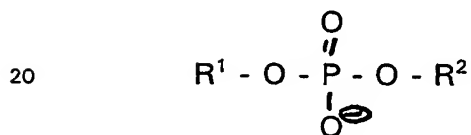
25 3. Verbindung nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
dass R¹ für einen 1-Octadecyl-2-methyl-sn-glycerin-Rest steht.

30 4. Verbindung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass R² für einen Glycerinrest steht.

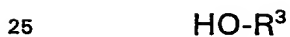
5. Verbindung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass R³ für einen Glycerinrest steht.

- 5 6. Verbindung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, ausgewählt
aus Cholesteryl-phospho-diglycerin, Cholesteryl-phospho-glycerin-
glyceroglycerin, Cholesteryl-phospho-di-glycoglycerin, 1,2-
Dimyristoyl-sn-glycero-3-phospho-diglycerin, 1,2-Dipalmitoyl-sn-
glycero-3-phospho-diglycerin, 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phospho-
10 diglycerin, 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-diglycerin, 1,2-
Dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-di-glycoglycerin, 1,2-Dioleoyl-sn-
glycero-3-phospho-di-glyceroglycerin.

- 15 7. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung nach Formel (I) gemäß
einem der Ansprüche 1 bis 6,
dadurch gekennzeichnet,
dass man eine Verbindung der Formel (II)



mit einer Verbindung der Formel (III)



verestert.

- 30 8. Liposom, enthaltend eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1
bis 6.

9. Arzneimittel enthaltend eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 oder ein Liposom nach Anspruch 7.

5 10. Verwendung einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 oder eines Liposoms nach Anspruch 8 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Krebs.